

University of Groningen

**Prevention and treatment of biomaterial related infection in orthopedics. A study of application of ultrasound and of antibiotic release.**

Ensing, Geert Tone

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Ensing, G. T. (2006). *Prevention and treatment of biomaterial related infection in orthopedics. A study of application of ultrasound and of antibiotic release.* s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# Samenvatting



## **Samenvatting**

Hoewel de toepassing van biomaterialen binnen de geneeskunde de kwaliteit van leven van patiënten heeft verbeterd, kan het optreden van een biomateriaalgeassocieerde infectie als een ernstige complicatie beschouwd worden. Vaak zijn drastische maatregelen nodig om de consequenties van deze infecties, die variëren van disfunctie van het biomateriaal tot het optreden van dodelijke sepsis, tegen te gaan.

Het onderzoek in dit proefschrift is vooral gericht op biomaterialen die in de orthopedie worden toegepast: antibioticahoudend botcement en gentamicinehoudende kralen. Het doel van dit proefschrift is om de preventie- en behandelingsmogelijkheden van geïnfecteerde heup- en knie-prothesen te vergroten door te onderzoeken of de tegenwoordig toegepaste systemen voor locale antibiotica-afgifte verbeterd kunnen worden, en of de toepassing van ultrageluid in combinatie met antibiotica-afgifte de bestrijding van biofilm infecties op biomaterialen verbeterd. Het hieruit voortvloeiende proefschrift bestaat uit vijf in vitro studies en één in vivo studie.

In **Hoofdstuk 1** wordt de brede toepassing van biomaterialen ter ondersteuning en herstel van lichaamsfuncties besproken, alsmede het risico op het optreden van een biomateriaalgeassocieerde infectie. Een biomateriaalgeassocieerde infectie wordt veroorzaakt door de vorming van een biofilm van bacteriën op een biomateriaal. Een biofilm heeft een fors verhoogde bacteriële resistentie in vergelijking met “normale”, planktonische, bacteriële infecties. Idealiter zou direct postoperatief een hoge antibioticaconcentratie rond een prothese bereikt moeten worden om de, ten gevolge van contaminatie tijdens de operatie, onvermijdelijk aanwezige planktonische bacteriën te bestrijden om zo te voorkomen dat zich een biofilm vormt en zich een infectie ontwikkelt.

Het voorkomen en behandelen van prothesegeassocieerde infecties is in dit proefschrift onderzocht bij biomaterialen die tegenwoordig in de orthopedie worden toegepast: botcement en gentamicinehoudende kralen. Botcement met of zonder antibiotica wordt gebruikt als een mechanisch vulmiddel om daarmee prothesecomponenten te verankeren. Gentamicinehoudende kralen worden losjes geplaatst in geïnfecteerde locaties in botholten en weke delen om osteomyelitis en weke delen infecties te kunnen bestrijden zoals tussen de twee operaties door bij revisiechirurgie.

Beide biomaterialen zorgen voor lokale antibiotica-afgifte met als doel het verlagen van de infectiepercentages. Van beide biomaterialen wordt aangenomen dat ze bestaan uit een min of meer ondoordringbare polymeer waarbij echter door aanwezige gaten en kanaaltjes in de matrix gentamicine zou kunnen diffunderen. Desondanks verloopt deze antibiotica-afgifte van een materiaal, dat (mede) als functie heeft de antibiotica lokaal af te geven, verre van ideaal, zowel wat betreft de totale hoeveelheid afgegeven antibiotica in de tijd, als in het patroon van antibiotica-afgifte. Gentamicinehoudend botcement geeft slechts 15% van de totaal aanwezige hoeveelheid antibiotica af, waarbij een hoge initiële antibiotica-afgifte wordt gevolgd door een lage antibiotica-afgifte in niet-bacteriedodende concentraties die mogelijk wel zouden kunnen bijdragen aan het ontstaan van gentamicineresistentie bij bacteriën. Het contrast met de antibiotica-afgifte van gentamicinehoudende kralen is groot (70% van de totaal aanwezige antibiotica wordt afgegeven in de eerste 14 dagen).

Het vinden van manieren om de antibiotica-afgifte te verhogen dan wel te versnellen zou interessant kunnen zijn bij deze toepassingen. De onderzoeksgroep onder leiding van W.G. Pitt (Utah, Verenigde Staten) heeft zich juist gericht op het verhogen van de effectiviteit van antibiotica. Hierbij werd de afgifte van antibiotica gecombineerd met het gelijktijdig toepassen van ultrageluid. Beide hierboven beschreven concepten zouden kunnen bijdragen tot een betere preventie, dan wel behandeling van biomateriaalgeassocieerde infecties in de orthopedie.

Het doel van de studie in **Hoofdstuk 2** was om vast te stellen of de toepassing van hierboven genoemd ultrageluid invloed heeft op de antibiotica-afgifte van gentamicinehoudende botcementen. Dit werd getest met drie verschillende commercieel verkrijgbare gentamicinehoudende botcementen, te weten Palacos R-G, Palamed G en CMW. Hierbij werden deze botcementen in twee verschillende configuraties getest: versgefabriceerd botcement zoals dit in de patiënt wordt geïmplant, en uitgelekt botcement (na drie weken antibiotica-afgifte in een fysiologische zoutoplossing) om de antibiotica-afgifte te simuleren na een periode van implantatie in het menselijke lichaam.

Het botcement werd gedurende 18 uur blootgesteld aan het ultrageluid (46.5 kHz, 1:3 pulstrein, met een gemiddelde akoestische intensiteit van 167 mW/cm<sup>2</sup>). Botcement dat niet werd blootgesteld aan ultrageluid diende als controlegroep. Een beperkte toename in gentamicineafgifte na blootstelling aan ultrageluid werd gemeten bij versgefabriceerd botcement. Deze toename werd niet gezien bij uitgelekt botcement. De beperkte toename van antibiotica-afgifte bij versgefabriceerd botcement bleek statistisch significant in een lineair regressie model. De toename in afgifte door ultrageluid zou op microstroming of een lokale temperatuurstijging kunnen berusten.

Hieropvolgend werd in **Hoofdstuk 3** onderzocht wat het effect van blootstelling aan ultrageluid is op de gentamicineafgifte van gentamicinehoudende kralen (Septopal). Dit werd vergeleken met de eerdere testresultaten van de gentamicinehoudende botcementen. Blootstelling aan ultrageluid bleek de gentamicineafgifte van gentamicinehoudende kralen aanzienlijk te vergroten, dit in tegenstelling tot de afgiftetoename bij de gentamicinehoudende botcementen. Daarnaast werden in deze studie ook de veranderingen die optreden na gentamicineafgifte aan het oppervlak van deze biomaterialen bestudeerd. Kwikporosimetrie, een meetmethode waarbij de distributie en de grootte van gaten aan het oppervlak van een materiaal gemeten kan worden, liet zien dat bij kralen het aantal gaten aan het oppervlak tussen 0.1 and 0.01 µm was toegenomen na

gentamicineafgifte, terwijl bij de botcementen geen toename in het aantal en distributie van gaten aan het oppervlak werd gezien. Derhalve werd in deze studie gesuggereerd dat de toename van gentamicineafgifte na blootstelling aan ultrageluid in gentamicinehoudende kralen verklaard zou kunnen worden door het optreden van microstroming in een poreuze structuur. Aangezien een effectieve behandeling van een infectie vraagt om hoge antibioticaconcentraties ter plaatse van de infectie kan een verhoogde afgifte van gentamicine door ultrageluid van klinische betekenis zijn, temeer het gelijktijdig toepassen van ultrageluid het bacteriedodende effect van antibiotica nog verder zou kunnen doen toenemen.

In **Hoofdstuk 4** werden de antibiotica-afgifte, antimicrobiële effectiviteit en biofilmvorming van gentamicine/clindamycine-houdend Copal botcement vergeleken met die van gentamicinehoudend Palacos R-G botcement. Copal is een recent op de Europese markt geïntroduceerd botcement en het is ontwikkeld voor gebruik bij revisiechirurgie. Hierbij is een tweede antibioticum toegevoegd aan het botcement, omdat gentamicineresistente bacteriestammen in toenemende mate worden aangetroffen in prothesegeassocieerde infecties. In deze studie bleek de antibiotica-afgifte van Copal botcement effectiever te zijn dan de afgifte van Palacos R-G: bij Copal werd maar liefst 65,1% van de totale hoeveelheid clindamicine en 40,5% van de totale hoeveelheid gentamicine afgegeven in 672 uur, terwijl dit bij Palacos R-G slechts 4,4% van de totale hoeveelheid gentamicine betrof in dezelfde tijdsduur.

Verder laat deze studie zien dat de vorming van een biofilm op het botcement effectiever verminderd kan worden door hogere gentamicineconcentraties af te geven in combinatie met afgifte van een tweede antibioticum. De betere afgiftekarakteristieken van Copal resulteren in toegenomen en langduriger antimicrobiële werking tegen een gentamicinegevoelige *Staphylococcus aureus* en een gentamicineresistente CNS. Tellen van bacteriën op plaat en bestudering van de biofilm met een confokale lasermicroscoop (de biofilm werd na kleuring onder de microscoop in beeld gebracht) liet daarbij op verschillende botcementen zien

dat antibiotica-afgifte door botcement de levensvatbaarheid van bacteriën daadwerkelijk vermindert. Dit was het duidelijkst zichtbaar dicht bij het botcementoppervlak, resulterend in een verandering van de dikte van de biofilm. Hierbij bleek dat Copal veel effectiever was in het verminderen van de biofilmdikte op het botcement dan Palacos R-G. Opvallend was hierbij dat bij biofilmreductie de matrix van de biofilm (EPS) wel toenam tussen dag 1 en dag 7, zelfs wanneer het aantal levende bacteriën op het oppervlak laag was.

Eerdere studies lieten verschillen in afgiftepatroon van gentamicinehoudende kralen en gentamicinehoudend botcement zien, evenals verschillen tussen gentamicinehoudend en gentamicine/clindamycine-houdend botcement, waarbij de toevoeging van een tweede antibioticum (clindamycine in het geval van Copal) ook de gentamicineafgifte deed toenemen. Daarom was het doel van de studie in **Hoofdstuk 5** de verschillen in structuur tussen deze biomaterialen te analyseren. Om dat te onderzoeken werd elektronenmicroscopie en kwikporosimetrie toegepast. Elektronenmicroscopie liet zien dat er gaten ontstonden aan het oppervlak van de antibioticahoudende botcementen na antibiotica-afgifte. Deze gaten waren afwezig voor antibiotica-afgifte. Dit lijkt erop te wijzen dat antibiotica-afgifte plaatsvindt vanaf het oppervlak. De ontstane gaten na antibiotica-afgifte waren groter bij gentamicine/clindamycine-houdend botcement in vergelijking met gentamicinehoudend botcement. In tegenstelling tot bij de botcementen wordt bij kralen gentamicine ook afgegeven vanuit de diepte van het materiaal. Hiermee lijkt deze studie aan te tonen dat, in vergelijking met gentamicinehoudende botcementen, antibiotica-afgifte gestimuleerd kan worden door gebruikmaking van grotere antibioticumpartikels (Copal botcement) of door gebruikmaking van een onderling verbonden netwerk in het biomateriaal (Septopal kralen). Verder wordt in deze studie duidelijk dat botcement vermengd met grote hoeveelheden antibiotica niet vergeleken kan worden met geprefabriceerde gentamicinehoudende kralen die wel een poreuze structuur hebben mét daarmee antibiotica-afgifte uit de diepte van het biomateriaal. Deze bevindingen moeten, zowel in de klinische praktijk als bij



vervolgonderzoek die als doel hebben de antibioticahoudende botcement en kralen te verbeteren, in acht genomen worden.

Het doel van de studie in **Hoofdstuk 6** was om te bestuderen of, getest op bacteriën afkomstig van patiënten met prothesegeassocieerde infecties, de levensvatbaarheid van bacteriën verder vermindert kon worden wanneer antibiotica-afgifte van botcementen gecombineerd werd met gelijktijdige toepassing van ultrageluid. Voor dit doel werden *Escherichia coli* ATCC 10798, *Staphylococcus aureus* 7323, CNS 7368, (gentamicineresistent) CNS 7391 en *Pseudomonas aeruginosa* 5148 gebruikt in combinatie met drie botcementen (gentamicinehoudend Palacos R-G, gentamicine/clindamycine-houdend Copal en Palacos R zonder gentamicine als controlegroep). De bacteriën werden getest in planktonische fase en in biofilmgroei. De levensvatbaarheid van deze bacteriën bij aan- en afwezigheid van ultrageluid (46.5 kHz, 1:3 pulstrein, met een gemiddelde akoestische intensiteit van 167 mW/cm<sup>2</sup>) gedurende 40 uur.

Blootstelling aan ultrageluid zonder antibiotica-afgifte sorteerde geen effect op de levensvatbaarheid van de geteste bacteriën. Echter, toepassing van ultrageluid in combinatie met antibiotica-afgifte van antibioticahoudend botcement zorgde voor een afname van zowel de bacteriën in planktonische fase als van de bacteriën in biofilm in vergelijking met blootstelling aan antibiotica zonder toepassing van ultrageluid. De *P. aeruginosa* stam vormde hierop een uitzondering.

Deze studie laat zien dat antibiotica-afgifte in combinatie met toepassing van ultrageluid de antimicrobiële effectiviteit bij meerdere klinische stammen vergroot. Toepassing van ultrageluid in combinatie met antibiotica-afgifte zou daarom in de praktijk kunnen leiden tot een betere preventie en behandeling van prothesegeassocieerde infecties.

Het doel van de studie in **Hoofdstuk 7** was om in een diermodel te onderzoeken of ultrageluid in combinatie met gentamicineafgifte de bacteriële levensvatbaarheid van een biofilm op botcement verder liet afnemen in vergelijking met alleen

gentamicineafgifte. Het toegepaste diermodel betrof een studie met konijnen, waarbij per konijn twee botcementmonsters met een *E. coli* ATCC 10798 biofilm werden geïmplant. Ultrageluid werd gecombineerd met gentamicineafgifte van gentamicinehoudend botcement of met gentamicineafgifte van systemisch (subcutaan) toegediend gentamicine. Er werden twee groepen botcement gebruikt: versgefabriceerd botcement en botcement dat was uitgelekt gedurende 14 dagen in een fysiologische zoutoplossing om de afgifte na een periode van implantatie te simuleren. Een van de twee geïmplanteerde disks werd tussen 24 en 72 uur na de operatie blootgesteld aan ultrageluid (28.48 kHz, 1:3 pulstrein, met een gemiddelde akoestische intensiteit van  $167 \text{ mW/cm}^2$ ), terwijl de andere disk niet blootgesteld werd aan ultrageluid om zo als controle(groep) te kunnen dienen.

Na het doden van het konijn werden de disks verwijderd, waarna het aantal levende bacteriën op de disks werd geteld. Verder werden huidmonsters ter plaatse van het gecreëerde infectie histopathologisch onderzocht. Het toepassen van ultrageluid resulteerde in een tendens van verhoogde effectiviteit van de gentamicine, zowel wanneer dit lokaal werd afgegeven als wanneer dit systemisch was toegediend. Blootstelling aan ultrageluid in combinatie met gentamicine verminderde de levensvatbaarheid van de biofilms in alle groepen met 58% tot 69% in vergelijking met de controlegroep. Aangezien bij histopathologisch onderzoek geen huidlaesies werden vastgesteld kon geconcludeerd worden dat de toepassing van ultrageluid veilig was in dit onderzoeksmodel. Deze studie impliceert dan ook dat toepassing van ultrageluid de preventie van infecties direct postoperatief zou kunnen verbeteren. De stap naar gecombineerde toepassing van de geteste biomaterialen, gentamicine en ultrageluid lijkt niet ver weg te hoeven zijn aangezien deze afzonderlijk allen reeds worden toegepast in de klinische praktijk.

In **Hoofdstuk 8** worden de resultaten van dit proefschrift beschreven in algemene termen. De experimentele modellen in dit proefschrift lijken aan te tonen dat de keuze om al dan niet te kiezen voor lokale antibiotica-afgifte, en de keuze met welk

materiaal voor antibiotica-afgifte te kiezen, allen van invloed zijn op de bacteriële overleving rond een prothese. Deze studies geven verder aan dat ultrageluid de preventie en behandeling van infecties kan verbeteren, aangezien: 1) ultrageluid veilig is, 2) ultrageluid de antibiotica-afgifte bij gentamicinehoudende kralen en gentamicine/clindamycine-houdende botcementen vergroot en 3) ultrageluid in combinatie met antibiotica-afgifte de bacteriële levensvatbaarheid verder doet afnemen in vergelijking met antibiotica-afgifte zonder ultrageluid. Het is verder van groot belang dat ultrageluid effectief lijkt te zijn bij meerdere klinisch relevante bacteriestammen, waaronder een gentamicineresistente stam. Dit geeft aan dat, wanneer ervoor gekozen wordt om antibioticahoudend botcement te implanteren, dit gecombineerd zou kunnen worden met toepassing van ultrageluid in de postoperatieve fase wanneer de antibiotica-afgifte van deze biomaterialen het hoogst is. Aansluitend worden in dit hoofdstuk de mechanismen van antibiotica-afgifte, het bio-akoestische effect en de implicaties van de resultaten van dit proefschrift voor andere medische deelgebieden besproken.

De belangrijkste volgende stap is het ontwikkelen van een experimentele studieopzet waarbij de effecten van toepassing van ultrageluid gecombineerd met antibiotica-afgifte worden toegepast in een klinische situatie. Klinische toepassing van ultrageluid kan succesvol zijn in andere medische velden wanneer dit gecombineerd wordt met hoge (lokale) antibioticaconcentraties; te denken valt hierbij aan bijvoorbeeld de diabetische voet, de geïnfecteerde vaatprothese of aan de immuungecompromitteerde patiënt met een lokaal infect.



